Hühner-Erythrocyten

Beitrag zur Frage nach der Antigenaktivität der Zellkerne

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER

DOKTORWÜRDE DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT BASEL

vorgelegt von

Robert Bernhart
von Degersheim (Kt. St. Gallen)

ZÜRICH 1950
Dissertationsdruckerei Leemann AG.

Hühner-Erythrocyten

Beitrag zur Frage nach der Antigenaktivität der Zellkerne

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER

DOKTORWÜRDE DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT BASEL

vorgelegt von

Robert Bernhart
von Degersheim (Kt. St. Gallen)

ZÜRICH 1950
Dissertationsdruckerei Leemann AG.

Von der Medizinischen Fakultät genehmigt am 14. Juni 1950 auf Antrag von Professor Dr. J. Tomcsik, Direktor des Hygienischen Instituts, Basel.

MEINEN LIEBEN ELTERN
MEINEM VEREHRTEN LEHRER PROFESSOR J. TOMCSIK
IN DANKBARKEIT ZUGEEIGNET

U. WW.
MADISON
LIBRARY

Inhaltsverzeichnis

Einleitung 7

I. Die Hühnererythrocyten in der Virusforschung

1. Die Virushaemagglutination 7
2. Der Virusreceptor 8

II. Die Antigene der Hühnererythrocyten

1. Antigenanalyse der Hühnererythrocyten 13
2. Die Lagerung der Antigene in den Hühnererythrocyten . . . 13
3. Die bisherigen Methoden der Zellkernisolierung 14
4. Neue Methode der Zellkernisolierung 15
5. Antigenaktivität von Stromata und Kernen der Hühnererythrocyten 16
6. Die physikalisch-chemischen Unterschiede der Kern- und Stromaeiweißkörper 19

Zusammenfassung 25

Schematische Zeichnung der Versuchsanordnung mit der «Sauerstoff-Strahlpumpe» 26

Literaturverzeichnis 27

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544315_0075

Einleitung

Hühnererythrocyten waren schon seit der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts gelegentlich Gegenstand wissenschaftlich-biologischer Untersuchungen. Dies verdankten sie vor allem dem Umstand, daß sie als kernhaltige Blutzellen leichter als organgebundene Zellen experimentellen Studien über Zell- und Kernprobleme zugänglich waren. So bildeten sie zu wiederholten Malen das Ausgangsmaterial zur Darstellung von Kernsubstanz und Nukleoproteiden. Andere Arbeiten beschäftigten sich mehr mit der vergleichenden Analyse von Hühnererythrocyten mit andern Erythrocyten. Eine dritte besondere Bedeutung erlangten die Hühnererythrocyten durch die Versuche von Hirst im Jahre 1941 über die Virushaemagglutination.

I. Die Hühnererythrocyten in der Virusforschung

1. Die Virushaemagglutination

Hirst (1) wies nach, daß Hühnererythrocyten agglutiniert werden durch Zugabe einer Suspension von Influenzaviren (PR8), die im Hühnerembryo gezüchtet worden sind. Die Agglutination kommt zustande durch eine quantitative Adsorption der Viren an die Erythrocytenoberfläche, mit gleichzeitiger Veränderung der elektrischen Ladung der Erythrocyten (2).

Die Agglutinationsstärke gestattete demnach eine mengenmäßige Bestimmung der Dichte der Virensuspension. Der Bindungscharakter der Viren an die Erythrocytenoberfläche ist nun aber keineswegs derjenige von Antigen mit Antikörper; denn unter dem Einfluß von Temperatur und Zeit lösen sich die Viren von den Erythrocyten wieder los, gewinnen alle ursprünglichen Eigenschaften zurück, während die Erythrocyten weiter nicht mehr agglutinabel sind. Bei Zugabe von wirklichen Virus-Antikörpern zum Virus-Erythrocytengemisch wird diese Bindung sofort völlig

hinfällig. Das Virus tritt in eine stabile Bindung mit dem Immun-Antikörper unter Verlust seiner pathogenen und anderen Eigenschaften. Nach Hirst (3) läßt sich nun die Veränderung der Erythrocytenoberfläche durch das Virus mit einer fermentativen Wirkung des Virus auf bestimmte, an der Erythrocytenoberfläche gelagerte, chemische Gruppen erklären. Diese Virusbindungsgruppen wurden als Receptorengruppen oder kurz als Virusreceptoren bezeichnet.

2. Der Virusreceptor

Über den Virusreceptor liegen in neuerer Zeit sehr zahlreiche Publikationen vor.

Hirst (4) vermutete, daß die Beziehung von Virus zu Virusreceptor den Schlüssel bieten kann für das Verständnis der Beziehung von Virus zur Wirtszelle überhaupt. Diese Vermutung rückte den Virusreceptor in den Vordergrund des Interesses.

Hirst (5) teilte schon in seinen ersten Arbeiten über Virushaemagglutination mit, daß das Normalhühnerserum einen Stoff enthält, der mit der Receptorsubstanz der Erythrocyten gemeinsame Eigenschaften hat und sich vom spezifischen Immun-Antikörper gut unterscheiden läßt. Weiterhin wurde bald erkannt, daß nicht nur Hühnererythrocyten und Hühnerserum diese Virusreceptoren besitzen, man konnte sie im Blut und in den Organen verschiedenster Tierarten und auch des Menschen nachweisen (6—9). Und zwar nicht nur Virusreceptoren für Influenzavirus, sondern für sehr viele Virusarten, wobei jeder Virusart wahrscheinlich ein eigener Receptor entspricht. Nach Bovarnick (10) und andern werden beispielsweise vom Influenzavirus neben Hühnererythrocyten auch Menschenerythrocyten agglutiniert, nicht aber Schaferythrocyten, während Mumpsvirus alle drei Erythrocytenarten zu agglutinieren vermag.

Ein zusätzliches Licht auf die charakteristische Verteilung der Virusreceptoren im Tierreich wirft folgender Umstand: Die Agglutination von Hühnererythrocyten gelingt vor allem nur durch solche Virusarten, deren Züchtung im Hühnerembryo möglich ist, während beispielsweise neurotrope, sowie verschiedene andere im

Hühnerembryo nicht züchtbare Virusarten keine Agglutination der Hühnererythrocyten geben. Systematische Versuche in dieser Richtung liegen allerdings keine vor.

Weiterhin ist interessant zu vernehmen, daß Hardy und Horsfall (8) in der Allantoisflüssigkeit des Hühnerembryo, dem Züchtungsmedium verschiedener Virusarten, eine Substanz finden konnten, welche mit dem Virusreceptor der Erythrocyten gemeinsame Eigenschaften hat und mit ihm wahrscheinlich identisch ist. Gibt man nämlich zu einem Gemisch Allantoisflüssigkeit-Influenzavirussuspension nachträglich Hühnererythrocyten hinzu, so werden diese nicht agglutiniert, weil die Viren durch die Receptoren der Allantoisflüssigkeit abgesättigt sind. Die Tatsache des Vorkommens des Virusreceptors in der Allantoisflüssigkeit gibt uns weiteren Anlaß zur Fragestellung nach der Bedeutung dieses Stoffes für die Virusvermehrung überhaupt.

Die Antwort auf diese wichtige prinzipielle Frage wird ermöglicht durch die ausgezeichneten Untersuchungen von Volkert und Horsfall (9) über das Mäusepneumonievirus. Das Züchtungsmedium dieser Virusart ist, wie der Name schon andeutet, die Mäuselunge, nicht aber der Hühnerembryo. Diese Virusart agglutiniert auch nur die Mäuseerythrocyten, nicht aber die Hühnererythrocyten.

Volkert und Horsfall wiesen nun im Lungengewebe der Maus einen Virusreceptor nach, welcher mit demjenigen an den Mäuseerythrocyten identisch ist. (Für den Gehalt der Lunge an Virusreceptoren ist aber nicht das dort vorhandene Blut verantwortlich, sondern das Lungengewebe selbst.) Volkert und Horsfall zeigten nun, daß die Schwere der durch intranasale Applikation gesetzten Virusinfektion bei verschiedenen Mäusearten in strenger Abhängigkeit war vom Titer der Virusreceptoren im betreffenden Lungengewebe; Tiere, in deren Lunge sich keine Receptorensubstanz nachweisen ließ, konnten mit Mäusepneumonievirus auch nicht infiziert werden.

Diese eindeutigen Resultate lassen wohl den allgemeinen Schluß ziehen, daß die Virusreceptoren im Blut und Gewebe der Tiere für das Angehen einer Virusinfektion und für die Virusvermehrung im Körper eine Vorbedingung sind. Oder anders for-

muliert: daß nur solche Tiere durch ein Virus infiziert werden können, welche den dem Virus entsprechenden Receptor besitzen. Diese unsere Schlußfolgerung aus den Versuchen von Volkert will also sagen, daß dem Virus der Zugang zur Zelle nur über die Kontaktnahme mit dem entsprechenden Virusreceptor möglich ist. Dies würde die spezifische Empfänglichkeit verschiedener Tierarten für bestimmte Viruserreger erklären.

Eine Nebenbeobachtung von Volkert bei seinen Arbeiten über das Mäusepneumonievirus bietet auch den Schlüssel für das Verständnis des typischen Tropismus der Viruskrankheiten: Baumwollratten, deren Lungengewebe den Receptor für Mäusepneumonievirus enthält, infolgedessen auch leicht infiziert werden konnten, besitzen hingegen an den Erythrocyten keine Receptoren. Ihre Erythrocyten lassen sich auch nicht agglutinieren durch Zugabe von Mäusepneumonievirus. Dieses Beispiel zeigt deutlich, daß der Virusreceptor bei einem Tier nicht auf alle Organe verbreitet sein muß, sondern daß gewisse Organsysteme den betreffenden Receptor allein besitzen können. In einer vielleicht noch gewagt erscheinenden Folgerung aus dieser Tatsache dürfen wir demnach vermuten, daß beispielsweise den neurotropen Virusarten der Weg zur Ausbreitung im Nervensystem über die dort vorhandenen Virusreceptoren, den dermatotropen Virusarten in analoger Weise über die in der Haut vorhandenen Virusreceptoren geöffnet wird. Ob nun der Gehalt an Virusreceptoren bei Mensch und Tier in den verschiedenen Organen im Laufe des Lebens konstant bleibt, ist nicht systematisch untersucht, läßt sich nur vermuten.

Über die Natur des Virusreceptors und über die Art seiner Verankerung in den Erythrocyten finden sich schon bei Hirst (4) wichtige Angaben. Für die Lagerung der Receptoren an die Erythrocytenoberfläche sind folgende experimentellen Ergebnisse beweisend: Bei Zerstörung der Erythrocytenstruktur durch irgendwelche Ursachen (Wärme, mechanische Zerstörung, tryptische Verdauung) sinkt das Virusbindungsvermögen der Erythrocyten stark ab bis auf $^1/_{20}$ und weniger. Haemolyse der Erythrocyten mit dest. Wasser bewirkt ebenfalls starkes Absinken des Virusbindungsvermögens, während Saponinhaemolyse keine Senkung

verursacht. Wären die Receptorengruppen auf die ganzen Erythrocyten gleichmäßig verteilt, also nicht nur an der Oberfläche, so würde die Zerstörung der Erythrocyten eher noch zusätzliche Virusreceptoren freimachen zur Virusbindung, was aber nicht der Fall ist. Daß während der labilen Bindung der Viren an die Virusreceptoren letztere eine tiefgreifende Veränderung erfahren, mit gleichzeitigem Verlust ihrer wesentlichen Eigenschaft des Virusbindungsvermögens, wurde schon oben angedeutet. Ein besonderes Licht in die Art der Einwirkung der Viren auf die Virusreceptoren brachte vor allem die von Hirst mitgeteilte Kenntnis der gleichartigen Einwirkung von Perjodat auf die Virusreceptoren. Dieses Perjodat hat bei den kleinen Konzentrationen, mit welchen in den Versuchen gearbeitet wurde, die allgemeine chemische Eigenschaft, die —C—C—Bindungen dort zu sprengen, wo sich eine —OH-Gruppe befindet. Na-Perjodat wirkt in gleicher Weise ausschaltend auf die Virusreceptoren der Erythrocyten und des Normalserums, ohne jedoch den spezifischen Virusimmunantikörper irgendwie zu beeinflussen. Die Tatsache des gleichartigen Verhaltens von Virus und Perjodat gegenüber den Virusreceptoren ist natürlich noch keineswegs ein Beweis dafür, daß das Virus an der gleichen chemischen Gruppe des Virusreceptors angreifen muß, sondern erleichtert uns nur die Vorstellung über die mögliche Art der Einwirkung des Virus auf den Virusreceptor.

Bei der oben begründeten berechtigten Hypothese, daß das Virus über die Kontaktnahme mit dem Virusreceptor den Zugang zur Wirtszelle findet, dürfen wir wohl in der Klarstellung der Beziehung von Virus zu Virusreceptor den ersten Schritt sehen in der Abklärung des Problems der Virusvermehrung im allgemeinen.

Deburgh und andern (11) gelang es nun, aus Menschenerythrocyten eine äther- und chloroformlösliche, aceton- und alkoholunlösliche Substanz zu isolieren, welche bei vorheriger Zugabe zur Virussuspension noch in einer Menge von 0,1 Gamma die Agglutination von Menschenerythrocyten durch Mumps- oder Influenzaviren zu hemmen vermochte. Unter dem Einfluß von Zeit und Temperatur wurde diese Substanz gleich dem Virusreceptor durch die Einwirkung der Viren völlig inaktiviert. Ob diese Sub-

stanz von Perjodat auch inaktiviert wird, ist nicht untersucht worden. Die unvollständige Elementaranalyse ergab mindestens 50 % Polysaccharide, 2,6 % Stickstoff und Fehlen des Phosphor. Die Autoren kamen zum Schluß, daß diese Substanz wahrscheinlich einer Abbaustufe des Virusreceptors oder vielleicht ihm selbst entspricht. Aus der Menschenlunge konnten sie einen gleichlöslichen Receptor isolieren, der jedoch nur die Agglutination der Erythrocyten durch das Mumpsvirus zu hemmen vermochte, nicht aber die Agglutination durch Influenzavirus. In den übrigen Organen des Menschen, aus welchen Friedewald und andere (6) ebenfalls unspezifische Hemmsubstanzen der Influenzavirushaemagglutination durch konzentrierte NaCl-Salz-Lösungen (5—10 %) extrahieren konnten, gelang ihnen der Nachweis einer gleichlöslichen Hemmsubstanz nicht.

Schwierige, vielfach noch unklare Verhältnisse zeigen sich bei der Durchsicht der Arbeiten über weitere unspezifische Hemmstoffe der Virushaemagglutination und der Virusvermehrung, die keine direkte Beziehung zum Virusreceptor haben. Diese Hemmstoffe haben vor allem dieses Merkmal gemeinsam, daß sie fast ohne Ausnahme Polysaccharide sind.

So fanden Horsfall und andere (12), daß verschiedene Polysaccharide die Infektion von Mäusen mit Mäusepneumonievirus zu hemmen vermögen, ohne daß jedoch diese Polysaccharide die Kontaktnahme der Viren mit den Virusreceptoren der Zellen verhinderten. Diese Polysaccharide wirkten auch unterschiedlich hemmend auf die Virushaemagglutination. Perjodat beeinflußte die Hemmwirkung der Polysaccharide nicht.

Ginsberg und andere (13) machten die gleiche Feststellung, daß Polysaccharide bakteriellen und anderen Ursprungs, welche die Entwicklung von Mumpsvirus im Hühnerembryo zu hemmen vermochten, weder am Virus noch am Virusreceptor ihren Angriffspunkt hatten und die Kontaktnahme der Viren mit dem Virusreceptor der Zelle nicht verhinderten. Sie vermuteten einen virostatischen Einfluß der Polysaccharide auf Grund einer Einwirkung auf den Zellstoffwechsel der Wirtszelle.

Eine ganze Reihe früherer Arbeiten (14—20) beschrieb die Hemmwirkung verschiedener Polysaccharide auf die Virusvermeh-

rung und Haemagglutination, ohne jedoch weiteres Licht in den Wirkungsmechanismus zu bringen. Auf alle Fälle genügt die Tatsache nicht, daß diese gefundenen Hemmstoffe der Virushaemagglutination Polysaccharide sind und die Analyse des wahrscheinlichen Virusreceptors einen mindestens 50%igen Gehalt an Polysacchariden ergab, beide Arten von Hemmstoffen in die gleiche Gruppe einzugliedern, wie viele Autoren es gewohnt sind zu tun.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit ist vor allem bemerkenswert und hervorzuheben, daß der Virusreceptor auf Grund der Arbeiten von Deburgh und andern (11) im Stroma der Erythrocyten enthalten ist, welches auch der Träger der wirklichen Antigene ist. Deshalb ist bedeutungsvoll zu vernehmen, daß sowohl die A- und B-Antigene, wie auch die Rh-Antigene keine Receptoreneigenschaften besitzen (6). Weiterhin lassen sich auch die mehr alkohollöslichen, heterogenetischen Antigene (Forßman-, Mononukleose- und Serumkrankheitsantigen) vom mehr äther- und chloroformlöslichen Virusreceptor gut unterscheiden (21—23).

II. Die Antigene der Hühnererythrocyten

1. Antigenanalyse der Hühnererythrocyten

In der Einleitung der Arbeit über „Die Antigenanalyse der Schaferythrocyten" weisen Tomcsik und Schwarzweiß (21) treffend auf den heutigen Stand der Antigenforschung hin: „Die Antigenstruktur der Erythrocyten ist trotz der kaum überblickbaren Zahl der diesbezüglichen Arbeiten wenig aufgeklärt".

Das Nebeneinander verschiedener heterogenetischer Antigene und des isogenetischen Antigens im gleichen Erythrocyten und die daraus sich ergebenden zahlreichen, schwer unterscheidbaren, spezifischen und unspezifischen Antigen-Antikörperreaktionen wurden in dieser Arbeit über die Schaferythrocyten klargestellt. Die Autoren arbeiteten eine Methode aus, die ihnen eine vollständige Trennung der wichtigen Antigene der Hammelerythrocyten

ermöglichte. Mit Hilfe dieser isolierten Antigene gelang es ihnen, neben andern die klinisch überaus wichtigen Antikörper der Serumkrankheit und des Pfeifferschen Drüsenfiebers eindeutig zu definieren (22, 23).

Die Hühnererythrocyten sind aber noch keineswegs so gut erforscht wie die Hammelerythrocyten. Über ihre Antigene finden sich in der neueren Literatur keine einschlägigen Arbeiten. Hingegen hat sich Kritschewsky schon vor 30 Jahren einläßlicher damit befaßt (24). Neben dem isogenetischen Antigen der Hühnererythrocyten konnte er im Anschluß an die Arbeiten von Forßman (25) über das Vorkommen eines heterogenetischen Antigens der Hammelerythrocyten in Blutkörperchen und Organen verschiedenster Tiere das betreffende Forßman-Antigen auch in den Hühnererythrocyten nachweisen, indem er zeigte, daß Kaninchen nach Immunisierung mit Hühnererythrocyten auch Antikörper gegen Hammelerythrocyten bildeten. Kritschewsky wies weiter nach, daß dieses Forßman-Antigen erst am 4. Tag der Bebrütung des Hühnereies im Hühnerembryo auftrat (26).

Endlich wollte Kritschewsky zeigen, daß auch in den Hammelerythrocyten ein heterogenetisches Antigen der Hühnererythrocyten enthalten sei (27). Zu diesem Zweck immunisierte er Kaninchen mit Hammelerythrocyten und konnte damit Haemolysine gegen Hühnererythrocyten erzeugen. Daß es sich bei diesen Versuchen aber wieder um das gleiche Forßman-Antigen handelte, geht aus der sichern Tatsache hervor, daß sowohl Hammel- wie auch Hühnererythrocyten dieses Antigen enthalten, und beide in Kaninchen Forßman-Antikörper erzeugen können.

Das Vorkommen weiterer heterogenetischer Antigene in den Hühnererythrocyten ist durch keine Arbeiten sichergestellt, läßt sich aber vermuten, da andere besser erforschte Erythrocyten ein Nebeneinander mehrerer heterogenetischer Antigene aufweisen.

2. Die Lagerung der Antigene in den Hühnererythrocyten

Über die örtliche Verankerung der Antigene im Hühnererythrocytenstroma und über die Lagerung der Antigene in den Erythrocyten überhaupt bestehen bis heute nur Vermutungen.

So ist noch keineswegs abgeklärt, ob die Antigene ausschließlich nur das Stroma der Erythrocytenoberfläche besetzen, oder ob sie auch im Stroma des Zelleibes enthalten sind. Freilich weisen die Antigen-Antikörperreaktionen mit der Oberflächenveränderung der Erythrocyten in Haemolyse und Agglutination eher auf die Oberflächenständigkeit der Antigene hin. Andrerseits ist es wahrscheinlich, daß bei der Immunisierung von Tieren mit artfremden Erythrocyten durch den Zellzerfall der einverleibten Erythrocyten auch antigenfähige Substanzen des Zellinnern freigemacht werden, welche Antikörper erzeugen können. Die Abklärung dieser Fragen ist wohl unmöglich, da die hiezu notwendige Trennung der Zellmembran vom Stroma des Zellinnern methodisch noch kaum anzugehen ist.

Bei kernhaltigen Zellen stellt sich noch eine weitere bis heute noch nicht gelöste Frage betreffs der Antigenverteilung. Nämlich, ob die Zellkerne auch antigenfähige Substanzen enthalten, und wenn ja, wieweit sich diese von den Stroma-Antigenen unterscheiden.

Die Antwort auf diese Frage läßt sich nicht voraussehen, wenn auch bekannt ist, daß Nukleoproteide animalischen Ursprungs geringe oder gar keine Antigenaktivität besitzen (28). Denn der Zellkern besteht ja wahrscheinlich nicht ausschließlich aus Nukleoproteiden. Vor allem aber hängt die Beantwortung der Fragen auch ab von der Möglichkeit, eine Trennung von Kern und Stroma herbeizuführen, ohne daß Stroma oder Kerne ihre ursprünglichen Antigeneigenschaften unter der Behandlung verändern oder einbüßen.

Wir stellten uns die Aufgabe, die Frage der Antigenaktivität der Erythrocytenkerne zu lösen. Vorerst galt es jedoch, eine Methode auszuarbeiten, welche eine schonungsvolle Trennung der Kerne vom Stroma gestattet.

3. Die bisherigen Methoden der Zellkernisolierung

Die in der Literatur bisher angegebenen Methoden der Kerndarstellung aus verschiedenem Ausgangsmaterial sind zum Zwecke der Antigenanalyse unzulänglich, teils weil sie sich begnügen mit

der Haemolyse von kernhaltigen Erythrocyten, wobei die Erythrocytenmembran dem Zellkern einfach aufliegt, teils weil sie mit Reagenzien arbeiten, welche sicher eine Denaturierung der Eiweißkörper mit sich bringen.

Miescher (29) versuchte als erster zwecks chemischer Analyse die Isolierung von Zellkernen. Hiezu unterwarf er Eiterzellen während 24 Stunden bei ca. 40° der Pepsineinwirkung, durch welche das Cytoplasma und Zelltrümmer aufgelöst, die freien Kerne aber intakt gelassen wurden. Auf ähnliche Weise erhielt Miescher die freien Zellkerne von Salmenspermien und isolierte so als erster das phosphorhaltige Nukleoprotein.

Behrens, 60 Jahre später, gebrauchte zur Kernisolierung eine zeitraubende Methode, indem er das Gewebe (verschiedener Organe) eintrocknete, darauf zu Pulver zerrieb mit dem Ziel, das Material zu mikroskopischen Fragmenten von Kerngröße zu zerkleinern und die „Kerne" hierauf auf Grund ihres besonderen spezifischen Gewichtes in geeigneten Lösungsmitteln von den übrigen Zelltrümmern zu trennen (30).

Croßmann isolierte die Zellkerne, indem er das Gewebe mit 5%iger Zitronensäure macerierte und die in der Lösung freigewordenen Zellkerne abzentrifugierte. Über Hühnererythrocyten hatte als erster schon Plosz im Jahre 1871 gearbeitet (32). 1904 isolierte Ackermann die Hühnererythrocytenkerne, indem er nach Haemolyse in destilliertem Wasser die Kerne in 3,6%iger NaCl-Lösung ausfällte (33). Warburg verwandte Einfrieren und Auftauen der Hühnererythrocyten zur Haemolyse und Isolierung der Kerne (34). Laskowsky schlug für den gleichen Zweck Lysolecithin als Haemolysemittel vor (35).

4. Neue Methode der Zellkernisolierung

Im Folgenden wird eine Methode beschrieben, welche eine annähernd vollständige Trennung von Stroma und Kernen bei kernhaltigen Erythrocyten ermöglicht, wobei die Eiweißkörper keine tiefergehende Veränderung erleiden, wo vor allem die Antigenaktivität erhalten bleibt. Die beiden gewonnenen Fraktionen

(Kern- und Stromafraktion) zeigen sowohl wesentliche biologische als auch physikalisch-chemische Unterschiede.

Ausgangsmaterial: Hühner verschiedener Rassen wurden durch Halsschnitt entblutet, das Blut in sterile Kolben aufgefangen und mit Glasperlen geschüttelt; dann durch sterile Filter von Glasperlen und Fibringerinnsel gereinigt und in sterile Kolben aufgenommen. Dieses Blut wurde hierauf 3 Minuten bei einer Tourenzahl von 2500/Min. zentrifugiert. Das überstehende Serum und der auf der Erythrocytenmasse aufliegende Leukocytenfilm wurden sorgfältig abpipettiert. Anschließend dreimaliges Waschen der Erythrocyten in physiologischer NaCl-Lösung, bis die überstehende Flüssigkeit nach dem Zentrifugieren gänzlich klar war. Das so gewaschene Erythrocytensediment wurde in sterilen Glaskolben im Eisschrank bei 3^0 C aufbewahrt als Materialreserve während höchstens sechs Tagen.

Methode: 1. 7 ccm gewaschene Erythrocyten wurden von 250 ccm dest. Wasser von 37^0 C übergossen, welches vorher während 5 Minuten bei dieser Temperatur mit CO_2-Gas durchströmt worden war. Nach ca. 5—10 Minuten trat eine vollständige Haemolyse ein mit einer Sedimentation der weißlichen Erythrocyten-Zelleiber. Das ausgetretene Haemoglobin bekam eine dunkelrote Farbe. Das pH des CO_2-gesättigten Wassers betrug ca. 4,5 bis 5, bei Zugabe der Erythrocyten stieg das pH auf ca. 6,5.

2. Nach kurzem Aufschütteln des Sedimentes zu einer gleichmäßigen Suspension, welches leicht gelingt, wurde diese in der Sauerstoffstrahllampe (Wasserstrahlpumpe mit Sauerstoff anstelle von Wasser) mit einem Druck von 5 Atmosphären gegen die Wand eines Glaskolbens geschleudert und in einem zweiten Glaskolben wieder aufgefangen. (Siehe Zeichnung.) Unter dieser Behandlung wurde das Haemoglobin wieder oxydiert und von hellroter Farbe. Diese Sauerstoffeinwirkung auf das Haemoglobin schien uns vor allem wichtig für dessen gänzliche Befreiung aus den Erythrocyten, da das oxydierte Haemoglobin nach unserer Erfahrung sich leichter aus den Erythrocyten auswaschen läßt. Beim Aufplatzen der Erythrocyten auf die Glaswand zersprengte der Zelleib, die

Kerne hingegen blieben intakt, quollen allerdings nach dieser Behandlung bis gut auf das Doppelte ihrer ursprünglichen Größe. (Phasenkonstrastmikroskop!)

3. Nun wurden sofort 250 ccm doppelt physiologische NaCl-Lösung von Zimmertemperatur unter ständgem Schütteln dazugegeben. Man erreichte damit wieder die physiologische Salzkonzentration, welche eine Entquellung der Erythrocytenkerne auf ihre normale Größe bewirkte. Die Zellstromata hafteten teilweise noch an den Kernen.

4. Ein zweites Mal wurde die Erythrocytensuspension an die Sauerstoffdruckpumpe angeschlossen und mit nurmehr 2,5 Atmosphären gegen die Wand des Glaskolbens gejagt. Die Kerne blieben auch nach dieser Druckanwendung noch intakt, die restlichen an den Kernen haftenden Stromata wurden dadurch gelöst. (Vielfach bildete sich nach der Druckbehandlung der Erythrocytensuspension ein rötlich-weißer Schaum, welcher größtenteils aneinander haftende Stromatateile enthielt. Durch mehrmaliges Aufschütteln gelang es, diesen Schaum fast vollständig in „Lösung" zu bringen. Ein Rest des Schaumes blieb jedoch an der Wand des Glaskolbens kleben und ging der weitern Behandlung verloren.)

5. Die Suspension wurde nun abgekühlt auf 5° C. Von jetzt an geschahen alle weitern Arbeitsprozesse in der Kälte.

6. Die wiederum gleichmäßig aufgeschüttelte Suspension wurde nun zentrifugiert bei einer Tourenzahl von 2500 pro Min. während 6 Minuten. Dabei sedimentierten alle Kerne und ein kleiner Stromaanteil, während der größte Teil des Stromas in Suspension blieb.

7. Das Sediment wurde in physiologischer NaCl-Lösung kräftig aufgeschüttelt zur homogenen Suspension, dann während 3 Minuten mit 2000 Touren pro Minute zentrifugiert, wobei die noch vorhandenen Stromaanteile in Suspension blieben mit einem geringen Teil von Erythrocytenkernen. Das Sediment enthielt nur intakte Kerne (im Phasenkontrastmikroskop). Die überstehende Flüssigkeit wurde weggeschüttet, das weiße Sediment nach nochmaligem Waschen mit physiologischer NaCl-Lösung im Exsiccator bei 37° C im Vakuum eingetrocknet.

8. Die überstehende Flüssigkeit von Nr. 6, in welcher sich die Stromata und das Haemoglobin befinden, kamen in die Sharples-Zentrifuge. Die Stromata sedimentierten in der Kälte bei einer Tourenzahl von 30 000 pro Minute als braunrote Masse, die ebenfalls im Exsiccator bei 37 ° C im Vakuum eingetrocknet wurde.

5. Die Antigenaktivität von Stromata und Kernen der Hühnererythrocyten

Die mit unserer Methode gewonnenen Hühnererythrocytenkerne und Stromata wurden auf ihre Antigenaktivität geprüft und zwar bezüglich des isogenetischen Antigens von Proteincharakter und bezüglich des in den Hühnererythrocyten vorkommenden heterogenetischen Forßman-Antigens. (S. Abschnitt 1.) Die Aktivität wurde bestimmt mittels des Adsorptionsversuches, wie er von Tomcsik und Schwarzweiß in ihrer Arbeit über „Antigenanalyse der Schaferythrocyten" angegeben wurde (21): 0,1 ccm einer bestimmten in einem Versuch konstant gehaltenen Serumverdünnung wurde mit 0,3 ccm einer abgestuft verdünnten Antigen- (Stroma und Kerne) Suspension vermischt und unter mehrmaligem Aufschütteln eine Stunde lang bei Zimmertemperatur gehalten. Der Verdünnungsgrad des Serums wurde am Versuchstag durch Ermittlung des Agglutinintiters berechnet, und zwar derartig, daß in 0,1 ccm des Adsorptionsgemisches die noch deutliche Agglutination gebende Serummenge enthalten war. Nach Ablauf der einstündigen Inkubationszeit wurden die Antigene (Stroma oder Kerne) abzentrifugiert und 0,1 ccm der überstehenden Flüssigkeit zur Agglutination verwendet. Zur Bestimmung des Agglutinintiters wurde durchwegs die Zentrifugiermethode verwendet, deren technische Ausführung unter andern von Glanzmann und Ottensooser (36) beschrieben wurde. Eine Abweichung in der von diesen Autoren beschriebenen Methode bestand darin, daß die Antikörperverdünnung jeweils mit dem doppelten Volumen von 1 % Erythrocytensuspension vermengt und die noch vollständige Agglutination aufweisende Serumverdünnung ohne Berechnung auf das Gesamtvolumen angegeben wurde.

Bei der Haemolyseeinstellung wurde der Haemolysintiter der entsprechenden Serumverdünnung ermittelt und eine Menge der

überstehenden Flüssigkeit genommen, welche bei der Verwendung der Standardtechnik noch eine sichere Haemolyse ergab. Diese bestand darin, daß vorerst je 0,5 ccm der verschiedenen Serumverdünnungen abgemessen wurden; darauf wurde das Volumen mit physiologischer NaCl-Lösung auf 1 ccm aufgefüllt und dann 0,25 ccm 2,5% Erythrocytensuspension (aus dem abzentrifugierten Sediment berechnet) sowie 0,25 ccm 1:10 verdünntes frisches Meerschweinchenserum (Komplement) zugegeben. Als Haemolysintiter wurde diejenige höchste Verdünnung des Serums betrachtet (in der ursprünglich abgemessenen 0,5 ccm Menge), bei der noch eine komplette Haemolyse zustande kam.

Tabelle 1 zeigt die Antigenaktivität von Stromata und Kernen der Hühnererythrocyten bezüglich des im Kaninchen gewonnenen Immunserums gegen Hühnererythrocyten, wobei die Durchschnittswerte mehrerer Versuche angegeben wurden.

Tabelle 1. Hemmung der Hühnererythrocyten-Agglutination durch Stromata und Kerne der Hühnererythrocyten.

Antikörper	Antigen	Antigenverdünnungen					
		1/33	66	132	264	528	
Hühnererythrocytenimmunserum aus Kaninchen 1:80	Stromata						
	Kerne						

Daraus ist deutlich ersichtlich, daß die Kerne im Gegensatz zu den Stromata keine Agglutinine zu binden vermögen. Daß es sich bei diesem Versuch um das isogenetische, thermolabile Antigen von Proteincharakter handelt, geht daraus hervor, daß sowohl nach Trypsinverdauung der Stromata, wie auch nach Stehenlassen der Stromata während einer halben Stunde im Wasserbad von 65—70° C die Agglutinationshemmung der Stromata gänzlich aufgehoben wird.

Tabelle 2 zeigt die Antigenaktivität von Stromata und Kernen der Hühnererythrocyten in der Haemolyseeinstellung bezüglich des gleichen Serums.

Tabelle 2. Hemmung der Hühnererythrocytenhaemolyse durch Stromata und Kerne der Hühnererythrocyten.

Antikörper	Antigen	Antigenverdünnungen						
		1/66	132	264	528	1056	2112	4224
Hühnererythrocytenimmunserum 1:640	Stromata							
	Kerne							

Wir ersehen daraus leicht, daß nur die Stromata befähigt sind, Haemolysin zu binden, daß also nur die Stromata Haemolysinantigen enthalten, nicht aber die Kerne. Bei diesem Versuch ist aber wahrscheinlich neben dem isogenetischen Antigen, welches vor allem Agglutinine produziert, in vorwiegendem Maße das Forßmanantigen und sein entsprechendes Haemolysin beteiligt, da durch die Immunisierung eines Forßmanantigen freien Tieres mit Forßmanantigen enthaltenden Erythrocyten, wie dies bei der Immunisierung von Kaninchen mit Hühnererythrocyten der Fall ist, neben dem isogenetischen Antikörper auch Forßmanantikörper gebildet werden, welche vor allem Haemolysine sind.

Tatsächlich zeigen auch bei der Haemolyseeinstellung von Hammelerythrocyten mit Forßman-Serum die Stromata der Hühnererythrocyten eine bedeutende Haemolysehemmung, während wiederum die Kerne keine Forßman-Haemolysine binden können. (Siehe Tabelle 3.)

Tabelle 3. Hemmung der Hammelerythrocyten-Haemolyse durch Stromata und Kerne der Hühnererythrocyten.

Antikörper	Antigen	Antigenverdünnungen							
		1/66	132	264	528	1056	2112	4224	8448
Forssmanserum 1:800	Stromata								
	Kerne								

Vergleichsweise wurden in einem weitern Versuch die Antigenaktivität einer Suspension intakter Hühnererythrocyten, haemolysierter Hühnererythrocyten (Haemolyse in CO_2 gesättigtem Wasser, zweimaliges Waschen und Aufnehmen der haemolysierten Erythrocyten in physiologischer NaCl-Lösung) der Antigenaktivität der nach unserer Methode gewonnenen Hühnererythrocytenstromata gegenübergestellt. Die Grundverdünnung der drei Antigene wurde so festgesetzt, daß die Trockensubstanz bei allen drei Suspensionen 30 mg/1 ccm betrug. (Siehe Tabelle 4.)

Tabelle 4. Agglutinationshemmung der Hühnererythrocyten durch intakte, haemolysierte Hühnererythrocyten und Erythrocytenstromata.

Antikörper	Antigen	Antigenverdünnungen				
		1/33	66	132	264	528
Hühnererythrocytenimmunserum 1:40	Intakte Erythr.					
	Hämolysierte E.					
	Stromata					

Aus der Tabelle 4 ist ersichtlich, daß die Antigenaktivität der Stromafraktion gegenüber derjenigen der intakten Erythrocyten und der haemolysierten Erythrocyten bedeutend zurückgegangen ist, besonders wenn man bedenkt, daß in den 30 mg Trockensubstanz der intakten und haemolysierten Erythrocyten auch die antigenfreien Kerne und bei den ersteren das antigenfreie Haemoglobin enthalten sind. Die Ursache des Zurückgehens der Antigenaktivität der Stromata beruht teils wohl auf der unzulänglichen Suspension der im Mörser zerriebenen Stromata, wodurch nicht alle vorhandenen antigenaktiven Gruppen in Kontakt mit den Antikörpern treten konnten, teils vielleicht auch darauf, daß selbst diese vorsichtige Behandlung der Stromata eine gewisse Schädigung des Antigens von Proteincharakter mit sich bringt.

Zur weiteren Beweisführung der erreichten Trennung der antigentragenden Stromata von der antigeninaktiven Kernsubstanz wurden mit diesen beiden Fraktionen Kaninchen immunisiert. Je zwei Kaninchen wurde während eines Monates zweimal wöchentlich 15 mg Stroma- oder Kernsubstanz, in 2 ccm physiologischer NaCl-Lösung suspendiert, in die Ohrvenen injiziert. Wider Erwarten zeigten die Immunsera der mit Stromata und mit Kernen immunisierten Kaninchen keine wesentlichen Unterschiede, indem beide Sera nur Antikörper gegen die Stromata enthielten und die Hühnererythrocyten in einem Endtiter von durchschnittlich 1 : 60 agglutinierten. Diese Ergebnisse sprechen gegen eine vollkommene Trennung von Stromata und Kernen der Hühnererythrocyten. Hingegen können sie angesichts der oben angeführten Resultate der Agglutinations- und Haemolysehemmung der Hühnererythrocytenstromata keineswegs als Beweis gelten dafür, daß auch die Erythrocytenkerne antigenhaltig sind. Besonders wenn man bedenkt, daß Bruchteile von Milligramm Antigen zur Tierimmunisierung genügen, versteht man, daß selbst eine minimale Verunreinigung der Kernfraktion mit Stromata bei der Immunisierung mit dieser Kernfraktion die Antikörperbildung gegen die Stromata wirksam anregen kann.

6. Die physikalisch-chemischen Unterschiede der Kern- und Stromeiweißkörper

Physikalisch-chemisch zeigen die mit unserer Methode getrennten Kerne und Stromata folgende Eigenschaften und Unterschiede:

Die im Mörser pulverisierte Trockensubstanz der Kerne und Stromata ließen sich beide bei einer Verdünnung von 1 : 1000 in $^1/_{100}$ normaler NaOH in klare Lösung bringen. Diese beiden Lösungen zeigen jedoch einen auffallenden Unterschied. Während die Lösung der Stromasubstanz eine gegenüber Wasser wenig vermehrte Viskosität besitzt, ist diese bei den gelösten Kernen auffallend groß und so ausgeprägt, daß beim Schütteln in die Lösung geratene Luftblasen wegen der Viskosität der Lösung nicht oder kaum mehr nach oben steigen. Bei Ansäuerung der alkalischen Lö-

sung der Kerne und der Stromata mit $^1/_{100}$ normaler HCl zeigen sich ebenfalls wieder auffallende Unterschiede. Die Stromaeiweißkörper fallen in einem engen pH-Bereich von ca. 5,3—5,5 in toto aus und gehen bei weiterer Ansäuerung wieder glatt in Lösung. Wahrscheinlich handelt es sich hier um das Ausfallen der Stromaeiweißkörper in ihrem isoelektrischen Punkte, in welchem bekanntlich die Eiweißkörper leicht spontan ausfallen können. Demgegenüber beginnen die Kerneiweißkörper bei einem vielleicht etwas tieferen pH auszufallen und bilden bei weiterer Säurezugabe ein zunehmend körniges Sediment, ohne im sauren pH-Bereich wieder in Lösung zu gehen. (Die pH-Werte müssen bei einer genaueren Kontrolle vielleicht etwas korrigiert werden, da wir mit zwei verschiedenen Potentiometern etwas unterschiedliche Werte erhielten.)

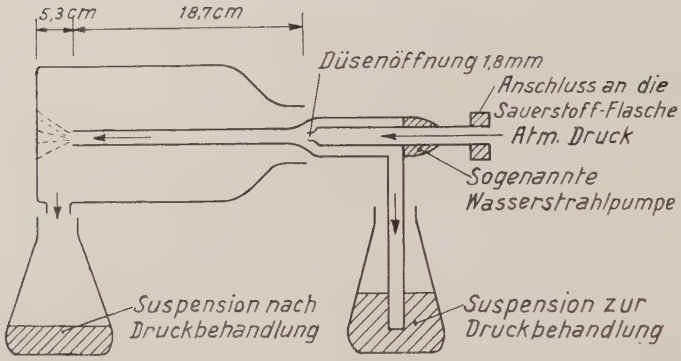
Die sichere Tatsache, daß die Kerneiweißkörper bei tieferem pH im Gegensatz zu den Stromaeiweißkörpern nicht mehr in Lösung gingen, ließ uns auch an die Möglichkeit denken, ihre Trennung auf chemischem Wege zu erreichen. Durch Säurezugabe zu den haemolysierten Erythrocyten bis zu einem pH von ca. 4 ließen sich die ausgefällten Kerneiweißkörper von den in Lösung bleibenden Stromaeiweißkörpern durch Abzentrifugieren ausschalten. Die Stromaeiweißkörper könnten dann durch Zugabe von Lauge in ihrem isoelektrischen Punkte ausgefällt werden. Diese Methode würde vielleicht genügen zur chemischen Darstellung und Isolierung der Stroma- und Kerneiweißkörper. Bei der Empfindlichkeit der Antigene, besonders des isogenetischen Antigens aber und bei der uns gestellten Aufgabe der Antigenanalyse durften wir uns mit dieser Methode nicht begnügen. Es zeigte sich denn auch, daß das im isoelektrischen Punkt ausgefällte Stroma in unseren Versuchen nur eine sehr schlechte oder gar keine Antigenaktivität besaß.

Zusammenfassung

Im ersten Teil (I) unserer Ausführungen wurde die Bedeutung der Hühnererythrocyten in der Virusforschung dargelegt und gezeigt, daß der erste Schritt der Virusvermehrung über die Kontaktnahme mit dem Virusreceptor geht. Die spezifische Verteilung der Virusreceptoren auf die einzelnen Tierarten und ihre Organsysteme konnten uns die besondere Empfänglichkeit verschiedener Tierarten für bestimmte Viruserreger wie auch den typischen Tropismus der Viruskrankheiten erklären. Weiterhin wurde festgestellt, daß die Virusreceptoren im Stroma der Erythrocyten enthalten sind, dem Träger der Antigene, sich aber sowohl biologisch wie auch chemisch von diesen Antigenen gut unterscheiden lassen.

Der zweite Teil (II) behandelte die eigentlichen Antigene der Hühnererythrocyten, wobei vor allem die Frage aufgeworfen wurde, ob nur die Stromata allein oder auch die Zellkerne Antigenträger sind. Die Antwort auf diese Frage wurde ermöglicht durch die Ausarbeitung einer Methode, welche eine nahezu vollständige Trennung von Stromata und Kernen der Hühnererythrocyten gestattete, ohne die Antigeneigenschaften der Eiweißkörper zu beeinträchtigen. Die mit dieser Methode gewonnenen Kern- und Stromaeiweißkörper zeigten wesentliche physikalisch-chemische Unterschiede. Vor allem aber konnte nun die Frage der Antigenaktivität der Zellkerne dahin beantwortet werden, daß die Kerne keine antigenfähigen Substanzen enthalten, da sie im Adsorptionsversuch keine Antikörper zu binden vermochten, und zwar weder Antikörper gegen das isogenetische Antigen noch solche gegen das heterogenetische Forßman-Antigen der Hühnererythrocyten.

Diese beiden Antigene sind also auf Grund unserer Versuche nur in den Stromata, nicht aber in den Kernen der Hühnererythrocyten enthalten.



Schematische Zeichnung der Versuchsanordnung mit der „Sauerstoffstrahlpumpe“.

Literaturverzeichnis

1. *Hirst, G. K.:* Science 1941, 94, 22.
2. *Haning, M.:* Proc. Soc. exp. Biol. and Med. 1948, 68, 385.
3. *Hirst, G. K.:* J. exp. Med. 1942, 76, 195.
4. — J. exp. Med. 1948, 87, 301 und 315.
5. — J. exp. Med. 1942, 75, 49.
6. *Friedewald, W., Miller, E. S.* and *Wathey, R.:* J. exp. Med. 1947, 86, 65.
7. *Hirst, G. K.:* J. exp. Med. 1943, 78, 99.
8. *Hardy, P. M. Jr.* and *Horsfall, F. L. Jr.:* J. exp. Med. 1948, 88, 563.
9. *Volkert, M.* and *Horsfall, F. L. Jr.:* J. exp. Med. 1947, 86, 393.
10. *Bovarnick, M.* and *Deburgh, P. M.:* Science 1947, 105, 550.
11. *Deburgh, P. M., Pen-chung Yu, Calderon Howe* and *Bovarnick, M.:* J. exp. Med. 1948, 87, 1.
12. *Horsfall, F. L.* and *McCarty:* J. exp. Med. 1947, 85, 623.
13. *Ginsberg, H. S., Goebel, W. F.* and *Horsfall, F. L. Jr.:* Proc. Soc. exp. Biol. and Med. 1947, 66, 99. J. exp. Med. 1948, 87, 385 und 411.
14. *Green, R. H.* and *Woolley, D. W.:* J. exp. Med. 1947, 86, 55.
15. *Armstrong, C.:* Publ. Health Rep., U. S. P. H. S., 1938, 53, 2004.
16. *Levine, P.* and *Frisch, A. W.:* Proc. Soc. exp. Biol. and Med. 1933, 30, 993 und 1933, 31, 46.
17. *Burnet, F. M.:* J. Path. and Bact. 1934, 38, 285.
18. *Gough, G. A. C.* and *Burnet, F. M.:* J. Path. and Bact. 1934, 38, 341.
19. *Johnson, J.:* Phytopathology 1941, 31, 679.
20. *Takahashi, W. N.:* Science 1942, 95, 586 und 1946, 104, 377.
21. *Tomcsik, J.* und *Schwarzweiß, H.:* Schweiz. Z. Path. und Bakt. 1947, 10, 407.
22. *Schwarzweiß, H.* and *Tomcsik, J.:* Proc. Soc. exp. Biol. and Med. 1948, 69, 558.
23. *Tomcsik, J.* and *Schwarzweiß, H.:* Proc. Soc. exp. Biol. and Med. 1948, 69, 562.
24. *Kritschewsky, J. L.:* J. exp. Med. 1916, 24, 233.
25. *Forßman, J.:* Biochemische Zeitschrift 1911, 37, 78.
26. *Kritschewsky, J. L.:* J. Inf. Deseases 1923, 32, 192.
27. — Z. f. Immunitätsforschung 1923, 36, 1.
28. *Karrer* et al.: Z. physiol. Chemie 1924, 135, 129. Helv. chim. acta 1925, 8, 384.

29. *Miescher, F.:* Histochemische und physiol. Arbeiten. Leipzig, F. C. W. Vogel, 1897, 1 und 2.
30. *Behrens, M.:* Z. physiol. Chemie 1932, 209, 59.
31. *Croßman, G.:* Science 1937, 85, 250.
32. *Plosz, P.:* Med. chem. Untersuchungen, Lab. angew. Chemie. Tübingen 1871, 4, 461.
33. *Ackermann, D.:* Z. physiol. Chemie, 1904—05, 43, 299.
34. *Warburg, O.:* Z. physiol. Chemie, 1910—11, 70, 413.
35. *Laskowski, M.:* Proc. Soc. exp. Biol. and Med. 1942, 49, 354.
36. *Glanzmann, E.* und *Ottensooser, F.:* Schweiz. med. Wschr. 1935, 520.

Curriculum vitae

Ich wurde geboren in St. Gallen am 7. August 1921 als Sohn von Gottfried Bernhart und Louise Bernhart, geb. Nenning. Heimatberechtigt bin ich in Degersheim (Toggenburg). Nach sechs Jahren Primarschule beschloß ich im Sommer 1940 das Mittelschulstudium mit der eidgenössischen Matura Typ A an der St. Gallischen Kantonsschule. Vorerst verbrachte ich zwei Semester an der Handelshochschule St. Gallen. Ich wechselte dann aber im Herbst 1941 die Fakultät und begann in Fribourg das Medizinstudium, wo ich im Herbst 1942 und Frühjahr 1944 die propädeutischen Examina ablegte. Die beiden ersten klinischen Semester hörte ich an der Universität Zürich, das dritte verbrachte ich an der Universität Lausanne. Nach dem zweiten klinischen Semester arbeitete ich als Unterassistent am Bezirksspital Uznach, nach dem dritten klinischen Semester während sechs Monaten im Kantonsspital Münsterlingen. Das folgende Semester hörte ich an der Universität Genf, die weiteren letzten drei Semester in Basel, um dort im Frühjahr 1948 das schweizerische Staatsexamen abzulegen.

Anschließend war ich mehrere Monate als Praxisvertreter bei verschiedenen Ärzten tätig. Während sechs Monaten arbeitete ich im Winter 1948/49 am Hygienischen Institut in Basel unter Herrn Prof. Dr. J. Tomcsik an einer experimentellen Dissertation. Bis zu Beginn 1950 war ich wieder als Ferienvertreter tätig bei verschiedenen praktischen Ärzten und im pathologischen Institut des Kantonsspitals Luzern. Seit Februar 1950 arbeite ich als Assistent im Sanatorium Wallenstadtberg (Kanton St. Gallen).